假眼小绿叶蝉微卫星位点的生物信息学分析

李 倩[1], 陈学新[2], 韩宝瑜[1,*]

(1. 中国计量大学生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018; 2. 浙江大学昆虫科学研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 农业部农业昆虫学重点实验室, 杭州 310058)

摘要:【目的】为开发假眼小绿叶蝉 *Empoasca vitis* 分子标记,采用高通量测序技术对假眼小绿叶蝉 DNA 进行了测序与分析。【方法】本研究基于 Illumina HiSeq 测序技术,构建了 PE 文库(~400 bp),对获得的测序数据利用生物信息学分析手段完成全基因组扫描,并进一步使用 MISA 分析鉴定基因组序列中出现的微卫星序列(SSR)。针对微卫星序列共设计 10 对引物,并使用 3 步法进行引物多态性筛选。【结果】共计检测 Scaffold 数量为 183 194 条,其中包含 SSR 的 Scaffold 共计1 545 条,共计筛选出 1 569 个 SSR 位点。在假眼小绿叶蝉的微卫星中,共包括 87 种重复基元类型,二核苷酸与三核苷酸重复序列为主要重复类型,分别占 SSRs 总数的 70.26% 和 27.84%;二核苷酸重复基元 CA/TG 和三核苷酸重复基元 AAT/ATT 是优势重复基元,分别占 SSRs 总数的 33.96% 和 5.86%。在设计的 10 对引物中,5 对具有多态性,在 8 个假眼小绿叶蝉个体中共发现 16 个等位基因。【结论】结果说明假眼小绿叶蝉 SSR 位点在多态性方面具有极大的可开发性,具有多态性的 SSR 位点可对假眼小绿叶蝉种群间的分化,种群间的扩散机理和途径及影响因素等问题提供分子视角。

关键词: 假眼小绿叶蝉; 基因组; 微卫星; 生物信息学; 高通量测序

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2016)04-421-06

Bioinformatic analysis of microsatellites in the tea green leafhopper, *Empoasca vitis* (Hemiptera: Cicadellidae)

LI Qian[1], CHEN Xue-Xin[2], HAN Bao-Yu[1,*] (1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University; State Key Laboratory of Rice Biology, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Agricultural Entomology, Hangzhou 310058, China)

Abstract:【Aim】In order to develop the molecular markers of the tea green leafhopper, *Empoasca vitis*, the high-throughput sequencing technologies were used in sequencing and analysis of DNA of the leafhopper.【Methods】Based on Illumina HiSeq sequencing technology, Illumina PE library (~400 bp) was constructed, and then the scanning of the whole genome sequences was finished using bioinformatics methods. Furthermore, MISA was used to identify the microsatellites in the genome. Ten pairs of primers were designed according to the microsatellite loci, and three-step procedure was used to screen the polymorphism of primers.【Results】Totally 183 194 scaffolds were examined, among which 1 545 contain microsatellites, and 1 569 microsatellites were identified in all these scaffolds. Among all 87 kinds of repeat motifs, the dominant microsatellite types were dinucleotide and trinucleotide repeats, accounting for 70.26% and 27.84% of the total SSRs, respectively, in *E. vitis*. CA/TG and AAT/ATT

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071744); 浙江省教育厅课题(Y201534310)

作者简介: 李倩, 女, 1987 年 2 月生, 山东聊城人, 博士, 讲师, 研究方向为茶树害虫分子生态与进化, E-mail: liqian2014@cjlu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: han-insect@263.net

收稿日期 Received: 2015-11-30; 接受日期 Accepted: 2016-03-04

are the most frequent motifs, accounting for 33.96% and 5.86% of the total SSRs, respectively. Five primers among 10 primers designed revealed polymorphism, and 16 alleles were detected from eight individuals of *E. vitis*. 【Conclusion】The results suggest that SSRs of *E. vitis* with polymorphism have potential for further use research. The polymorphism of SSRs may provide a molecular perspective of population divergence, dispersal mechanisms, diffusion path and influencing factors in *E. vitis*.

Key words: *Empoasca vitis*; genome; microsatellite; bioinformatics; high-throughput sequencing

假眼小绿叶蝉 *Empoasca vitis* (Göthe) 是我国茶树上的头号害虫,广泛分布于我国江南、江北、西南和华南四大茶区的 17 个省市,主要刺吸茶树嫩梢造成危害,直接影响茶叶品质,造成减产(杨青和余德亿,2008)。该虫世代重叠严重,繁殖速度快,危害历期长,而且雌虫将卵产于嫩茎皮层下,破坏输导组织,给该虫的防治带来极大困难。在长江中下游地区,正常年份假眼小绿叶蝉的为害导致夏、秋茶损失率达 10% ~15% ,重灾年份损失甚至高达 50% 以上(朱俊庆,1999)。

微卫星 DNA 标记(microsatellite DNA)是指简单重复的 DNA 片段(simple sequence repeats, SSR),其每个重复单位一般为 1 ~ 6 个碱基(Chambers and MacAvoy, 2000),由于重复次数不同及重复程度不完全而造成了每个基因座上等位基因的多态性。微卫星 DNA 序列较短而且重复频率高,有利于标记分析的自动化。除此以外,微卫星标记还具有 DNA 用量少、反应速度快、操作简易、结果重复性好等特点。微卫星标记可用于研究遗传变异性低而不易处理的种群遗传学问题,不仅能够发现显著的遗传分化,而且分化的程度还能够普遍地反映地理分布,根据微卫星标记可以得到基因频率,再预测给定样本的由来 (Selkoe and Toonen, 2006)。

目前开发微卫星的主要手段主要有传统方法、省略筛库法、富集法、EST 序列筛选法等。随着二代测序技术的发展,基于二代测序技术开发微卫星位点也成为热门。二代测序技术实现了自动化样本制备及大规模平行测序,极大地推动了微卫星序列的开发。并且此技术对样本要求量较少,文库构建过程简单,减少了样品分离和制备的时间,数据获取质量较高,且运行成本逐渐降低,是性价比较高的新一代测序技术。

目前国内对假眼小绿叶蝉的生物生态学特性、种群动态、化学防治及信息素等已进行了一些较深入的研究报道(朱俊庆, 1999; 徐金汉等, 2005; 韩宝瑜等, 2009; 钮羽群等, 2015),但对于该虫种群遗传方面的研究较少,包括了解是否存在致害能力差异的种群分化,种群间的扩散机理、途径及影响因素,害虫是否具有对特定寄主的偏好和适应等问题。因此,本研究采用二代测序技术快速获取大量假眼小绿叶蝉 SSR 位点数据并利用其开展种群遗传学方面的研究,以期在分子水平上对假眼小绿叶蝉的种群遗传学提供更加有力的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 基于二代测序技术的假眼小绿叶蝉微卫星分离

本研究使用的假眼小绿叶蝉成虫于 2015 年 9 月采集自浙江杭州梅家坞,浸泡于无水乙醇中,保存于 -20℃ 冰箱。选取 50 头成虫,每 10 头为一组提取基因组 DNA,使用动物组织快速提取试剂盒(VWI),所提取 5 份 DNA 样品编号分别为 EV-1 ~ 5。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的基因组 DNA 样品,最终选用 DNA 样品质量较好的编号为 EV-3 的模板进行测序。对样品 DNA 进行片段化处理,打断的 DNA 片段约 300 ~ 500 bp,加接头后,构建基因组文库(~400 bp)。采用 Illumina HiSeq 测序技术对样品的 DNA 进行 paired-end (PE) 测序。测序委托上海凌恩生物科技有限公司进行。

使用 MISA (http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/) 对拼接后数据进行 SSR 位点搜索,当 SSR 长度大于 20 bp 时多态性较高,长度在 12 ~20 bp 之间的多态性中等,长度在 12 bp 以下时多态性极低(Temnykh, 2001)参数设置为:重复基元 2 ~5 bp,二核苷酸重复次数在 6 次以上,三、四和五核苷酸重复的次数在 5 次及 5 次以上。

1.2 引物设计

我们使用 Primer(http://primer3.ut.ee/) 测试所有 SSR 位点两侧是否有合适的 PCR 引物,设计标准如下:(1) 引物长度 19 ~28 bp; (2) 产物长度 100 ~280 bp; (3) 引物退火温度在 57 ~62℃。

1.3 引物筛选以及位点多态性检测

我们使用 3 步法对所设计引物进行筛选,所谓

3 步法即前 2 步是对引物的扩增性进行检测，最后一步是对位点多态性进行验证。所用标本分别来自杭州梅家坞（MJW）、丽水大姆山茶场（DMS）、山东青岛（QD）、江苏苏州（SZ）、安徽金寨（JZ）、安徽黄山（HS）、湖北恩施（ES）和河南信阳（XY）共 6 个省市的 8 个地区，所用样本均保存于无水乙醇中。每个地区采用 1 头标本，共 8 个个体。基因组 DNA 提取使用动物组织快速提取试剂盒（VWI）。

第 1 步：对引物的可扩增性进行检测。将上述 8 个地区样品使用 TaKaRa Taq 试剂盒进行扩增。扩增体系为 15 μL，包含 10×Buffer 1.5 μL，dNTPs 1.2 μL，引物各 0.6 μL，模板 0.5 μL，Taq 酶 0.1 μL，不足部分使用 ddH_2O 补齐。反应条件为：95℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 45 s，56℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 1.5 min，共进行 35 个循环；最后 72℃ 延伸 10 min，12℃ 保存。PCR 产物以 2% 琼脂糖电泳进行初检测，选择目的片段在 100～300 bp 左右的单一产物，并标记所使用的引物。

第 2 步：根据 Blacket 等（2012）方法将第 1 步中筛选出的可用正向引物 5′端加 1 个 TailC 尾巴。PCR 反应体系中包含了 3 条引物，分别为正向引物（0.04 μmol/L），反向引物（0.16 μmol/L）和 TailC 修饰的正向引物（0.32 μmol/L），反应条件同上。PCR 产物以 2% 琼脂糖电泳进行初检测，将于扩增片段不单一或扩增个体数少于 5 个的引物丢弃。

第 3 步：将 TailC 修饰的正向引物荧光化（FAM 和 ROX），并重复第 2 步的实验操作。PCR 产物使用 ABI3730XL 测序仪（Applied Biosystems）的 GeneScan 500 LIZ 分子量内标（Applied Biosystems）进行扫描。微卫星分型使用 GENEMAPPER4.0 软件完成（Applied Biosystems）。

2　结果

2.1　假眼小绿叶蝉 SSR 位点的数量与分布

使用 MISA 分析鉴定基因组序列中出现的 SSR 序列，共计检测序列数量为 183 194 条，所有序列长度为 80 270 719 bp，其中包含 SSR 的序列共计 1 545 条，共计筛选出 1 569 个 SSR 位点，包含 1 个以上 SSR 位点的序列有 23 条。将 SSR 总数与检测的数量相除，得到 SSR 位点的出现频率为 0.85%。

2.2　假眼小绿叶蝉 SSR 特性

在假眼小绿叶蝉的 SSRs 中，共包括 87 种重复基元类型，其中二、三、四和五核苷酸的类型分别为 12，50，24 和 1 种（图 1：A），以三核苷酸基于类型为最多。在所有重复序列中，二核苷酸与三核苷酸重复序列为主要重复类型，分别占 SSRs 总数的 70.26% 和 27.84%（图 1：B）；二核苷酸重复基元 CA/TG 和三核苷酸重复基元 AAT/ATT 是优势重复基元，分别占 SSRs 总数的 33.96% 和 5.86%（表 1）。四核苷酸重复基元与五核苷酸重复基元数量较少，出现的频率均较低。

表 1　SSR 类型与数量

Table 1　Types and numbers of SSRs

SSR 长度 Length of SSRs	重复类型 Repeat type	SSR 总数 Total number of SSRs	SSR 数量 Number of SSRs（≥20 bp）
二核苷酸 Dinucleotide	AG/CT	325	8
	AT/AT	229	1
	CA/TG	521	12
	GC/CG	4	0
三核苷酸 Trinucleotide	AAT/ATT	90	0
	ACA/TGT	27	1
	AGC/GCT	11	1
	ATG/CAT	29	0
	CAC/GTG	9	0
	CCG/CGG	2	1
	CTC/GAG	8	1
	CTG/CAG	10	0
	GAA/TTC	41	0
	GCA/TGC	7	1
	GCG/CGC	2	0
	GTT/AAC	47	0
	TAG/CTA	29	0
	TAT/ATA	37	0
	TCC/GGA	10	1
	TCT/AGA	20	0
	TGA/TCA	27	1
	TGG/CCA	20	0
四核苷酸 Tetranucleotide	AAAT/ATTT	5	5
	AAGG/CCTT	1	1
	AGAT/ATCT	3	3
	ATCC/ATGG	5	5
	ACAG/CTGT	5	5
	AGCG/CGCT	1	1
	AAAC/GTTT	2	2
	AACC/GGTT	1	1
	AATC/ATTG	2	2
	ACCT/AGGT	1	1
	AATT/AATT	1	1
	AAAG/CTTT	1	1
五核苷酸 Pentanucleotide	TTGCT	1	1
总计 Total	87	1569	57

2.3　假眼小绿叶蝉转录组 SSR 的可用性评价

具有多态性的 SSR 作为优秀分子标记广泛使用，SSR 长度是影响其多态性的重要影响因素。本研

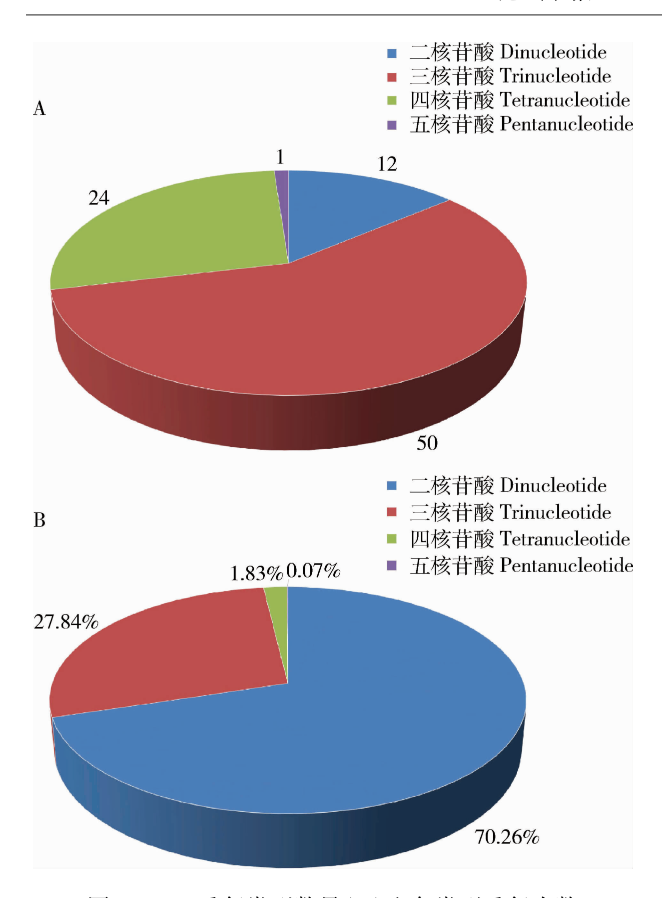


图 1 SSR 重复类型数量(A)和各类型重复次数所占比例(B)

Fig. 1 Number of repeat types (A) and the proportion of the number of repeats of each type (B) in SSRs

究采用重复基元 2～5 bp,二核苷酸重复次数在 6 次及以上,三至五核苷酸重复次数 5 次及以上的为筛选标准。经统计发现,所有 SSR 长度均在 12 bp 以上,长度在 20 bp 以上的共计 57 条,其中的 2 条位于同一条 Scaffold 上,其余均在不同的 Scaffold 内。本研究获得了大量假眼小绿叶蝉的微卫星位点,为假眼小绿叶蝉种群遗传学的研究提供了更多的分子标记。

2.4 部分微卫星位点多态性差异的检测

根据所筛选出的微卫星序列,共设计了 10 对引物进行检测,所设计引物信息见表 2。所有 10 对引物在 8 个被检测的假眼小绿叶蝉中均具有可扩增性,使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后均表现为单一条带。经检测,EVMS01,EVMS02,EVMS05,EVMS06 和 EVMS10 表现出多态性:5 对引物在 8 个假眼小绿叶蝉个体中共发现 16 个等位基因,其中 DMS, ES, HS, JZ, MJW, QD, SZ 和 XY 的单个个体分别具有 6, 8, 6, 9, 8, 7, 8 和 9 个等位基因;其中位点 EVMS01 和 EVMS05 的等位基因数目最多,均为 4 个;位点 EVMS10 的等位基因数目最少,仅有 2 个;EVMS02 和 EVMS06 等位基因数目为 3 个;平均每个位点为 2 个等位基因。各微卫星位点在不同地理种群的个体中等位基因有一定的差异。

表 2 微卫星引物序列信息

Table 2 Information of primer sequences

位点 Loci	重复结构 Repeat motif	引物序列(5′-3′) Primer sequences	产物大小(bp) Product size
EVMS01	(CT)7	F: AACACATCACATGCGACCAT R: CCTAAATGTAACCATTCACCTGC	278
EVMS02	(GCT)5	F: GATGGAGAAGGAATGTTCGC R: GTCCAGAAAGGATGAACGGA	213
EVMS03	(CT)7	F: CTTCACGGATGTTGTTGAGC R: CGACCAACAGTTGCGTAAAA	267
EVMS04	(CA)6	F: GTCGCAATTGGCTAGAGAGG R: GCTTGGATGTTTTGAGCTACG	272
EVMS05	(TAA)5	F: GATTTTTGGGCTCCTGTCAA R: CATGTATTATTAGACTTGGTCAAGCA	158
EVMS06	(TGA)5	F: CTTCGAGTCCGCTTTGAAAC R: TGCTCATGCGTAATTGCTTC	108
EVMS07	(TAAT)5	F: CCGTGTAAAACCAAGCGAAA R: GGGAGGGAACGTGTAAAACTC	280
EVMS08	(AC)9	F: TTCCAAAAGTCTTGCCTTCAA R: ACGCTGCTTGCTAGTTGGTT	229
EVMS09	(TCT)6	F: GTCTGTAGCCAGTTCCCACC R: AGAACCGGTCCAATCAAGTG	223
EVMS10	(AAT)5	F: GGTTTGAATGGGCTCAGATT R: CCTAGGAAAGCGTGGTCAAG	145

3　讨论

在本研究中，三核苷酸重复基元类型在假眼小绿叶蝉 SSR 中最丰富达 50 种。三核苷酸重复基元不仅仅在假眼小绿叶蝉中，在叶蝉 *Oncometopia nigricans*、*Graphocephala atropunctata*、*Camellia sinensis* 和 *Circulifer tenellu*（胡德辉等，2013），褐飞虱 *Nilaparvata lugens*（刘玉娣和侯茂林，2010）以及德国小蠊 *Blattella germanica*（王晨等，2015）等其他物种内，三核苷酸重复基元同样为优势重复基元。但在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（Schug *et al.*，1998）、西方蜜蜂 *Apis mellifera*（魏朝明等，2007）和金小蜂类 *Nasonia*（Pannebakker *et al.*，2010）等物种中以二碱基重复基元为主；在西花蓟马 *Frankliniella occidentalis*（段惠生等，2012）和肩突硬蜱 *Ixodes scapularis*（汪自立等，2013）等昆虫中，主要的重复基元为单碱基重复。在假眼小绿叶蝉三核苷酸重复基元中尤以 AAT/ATT 类数量最丰富，在以上 4 种叶蝉的微卫星分析中三核苷酸 SSR 基序中最大比例的也是 AAT 类。在鲤鱼 *Cyprinus carpio* 中，也以 AAT 类最多，ATC 类次之（Wang *et al.*，2007）。造成 AAT 类数量丰富的原因与其高滑变率及其作为终止密码子的延伸区可能有一定关系。目前较为流行的观点认为微卫星的产生是 DNA 滑移和 DNA 复制修复系统共同作用的结果（Schlötterer and Tautz，1992；Heale and Petes，1995）。DNA 滑移率受多种因素影响，如微卫星序列的长度（Wierdle *et al.*，1997）、基本重复单位的长度（Schlötterer and Tautz，1992；Hite *et al.*，1996）以及 AT 含量的影响（Hite *et al.*，1996）等等。

我国对假眼小绿叶蝉的遗传变异研究处于起步阶段，研究所涉及分子标记较少。目前已经使用的分子标记主要为核基因、线粒体基因，而对于解决种群遗传学问题表现优异的微卫星位点并未涉及。付建玉和韩宝瑜（2007）采用 16 条 10 bp 随机引物对采自浙江、江苏、安徽、云南、福建、海南和山东 7 省茶区的假眼小绿叶蝉种群进行 RAPD 标记分析，得到 78 条多态性条带，多态性为 64.46%，然后通过构建系统发育树，确定安徽省十字铺和福建省福安两种群聚为一支，山东临沂种群和云南西双版纳种群与其他 5 种群聚类，根据结果推断假眼小绿叶蝉亲缘关系的远近与地理距离有一定的相关性。而基于线粒体部分基因序列的研究，得到的结果是与之相反的。基于部分 16S rRNA 基因序列对 12 个不同地区的假眼小绿叶蝉地理种群及遗传结构进行分析，结果表明：不同地理种群的遗传距离与地理分布不具有直接对应的关系，而且各地理种群的单倍型呈现一种混杂的分布格局，未显示出与地理分布的一致性（李乐等，2013）。基于线粒体 COI 基因全长序列对我国 13 个主要产茶省份假眼小绿叶蝉的地理种群进行分析，同样表明遗传距离与地理距离之间不具有相关性，遗传差异较小（周宁宁等，2014）。

本研究基于高通量二代测序技术筛选了假眼小绿叶蝉的微卫星序列，获得了丰富的 SSR 信息，并初步检测了收集于国内 8 个不同地方的假眼小绿叶蝉个体的微卫星位点多态性差异，发现的这些 SSR 具有较高的可用性，为开发假眼小绿叶蝉 SSR 分子标记奠定基础。与此同时，SSR 分子标记的开发和利用，对于假眼小绿叶蝉致害能力差异的种群分化，种群间的扩散机理、途径及影响因素等问题的解答提供了分子水平的视角，可为该害虫的持续控制提供基础资料。

参考文献（References）

Blacket MJ, Robin C, Good RT, Lee SF, Miller AD, 2012. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments – an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol. Ecol. Resour.*, 12(3): 456 – 463

Chambers GK, MacAvoy ES, 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 126: 455 – 476.

Duan HS, Zhang AS, Zhao CZ, Yu Y, Chu D, 2012. Characterization and molecular maker screening of EST-SSRs and their polymorphism compared with Genomic-SSRs in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(6): 634 – 640.［段惠生，张安盛，赵传志，于毅，褚栋，2012. 西花蓟马 EST-SSR 信息分析、标记筛选及其与 Genomic-SSR 的多态性比较. 昆虫学报，55(6): 634 – 640］

Fu JY, Han BY, 2007. Studies on genetic relationships among populations of *Empoasca vitis* (Gothe) from tea gardens in seven provinces based on RAPD analysis. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 19(1): 11 – 14.［付建玉，韩宝瑜，2007. 七省茶园假眼小绿叶蝉的 RAPD 分析及其亲缘关系探讨. 浙江农业学报，19(1): 11 – 14］

Han BY, Lin JL, Zhou XG, Zhang JM, 2009. Investigation of morphology of eggs of tea green leafhoppers and morphology and parasitic percentages of mymarids parasitizing the leafhopper eggs. *Journal of Anhui Agricultural University*, 36(1): 13 – 17.［韩宝瑜，林金丽，周孝贵，章金明，2009. 假眼小绿叶蝉卵及寄生蜂缨小蜂形态观察和寄生率考评. 安徽农业大学学报，36(1): 13 – 17］

Heale SM, Petes TD, 1995. The stabilization of repetitive tracts of DNA

by variant repeats requires a functional DNA mismatch repair system. *Cell*, 83(4): 539 – 545.

Hite JM, Echert KA, Chery KC, 1996. Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of d(C-A)n · d(G-T)n microsatellite repeats. *Nucleic Acids Res.*, 24(12): 2429 – 2434.

Hu DH, Jiao XZ, Sang HY, Qiu YF, Li RB, 2013. Analysis of microsatellite information in EST resource of leafhopper. *Journal of Southern Agriculture*, 44(4): 558 – 561. [胡德辉, 焦晓真, 桑洪玉, 邱永福, 李容柏, 2013. 叶蝉 EST 资源的微卫星信息分析. 南方农业学报, 44(4): 558 – 561]

Li L, Fu JY, Xiao Q, 2013. Sequence analysis of the mtDNA gene and genetic differentiation in geographic population in geographic populations of *Empoasca vitis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50: 675 – 685. [李乐, 付建玉, 肖强, 2013. 假眼小绿叶蝉地理种群的线粒体 DNA 16SrRNA 基因序列分析及遗传分化研究. 应用昆虫学报, 50: 675 – 685]

Liu YD, Hou ML, 2010. Analysis of microsatellite information in EST resource of *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(3): 239 – 247. [刘玉娣, 侯茂林, 2010. 褐飞虱 EST 资源的微卫星信息分析. 昆虫学报, 53(3): 239 – 247]

Niu YQ, Wang MX, Cui L, Ye HX, Pan C, Han BY, 2015. Control of the tea green leafhopper via volatile compounds of rosemary: the potential for further development of a push-pull strategy. *Acta Ecologica Sinica*, 35(7): 2380 – 2387. [钮羽群, 王梦馨, 崔林, 叶火香, 潘铖, 韩宝瑜, 2015. 迷迭香挥发物不同组合对假眼小绿叶蝉行为的调控. 生态学报, 35(7): 2380 – 2387]

Pannebakker BA, Niehuis O, Hedley A, Gadau J, Shuker DM, 2010. The distribution of microsatellites in the *Nasonia parasitoid* wasp genome. *Insect Mol. Biol.*, 19: 91 – 98

Schlötterer C, Tautz D, 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.*, 20(2): 211 – 215.

Selkoe KA, Toonen RJ, 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.*, 9: 615 – 629.

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S, 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res.*, 11(8): 1441 – 1452.

Wang C, Du LM, Li P, Yang MY, Li WJ, Shen YM, Zhang XY, Yue BS, 2015. Distribution patterns of microsatellites in the genome of the German cockroach (*Blattella germanica*). *Acta Entomologica Sinica*, 58(10): 1037 – 1045. [王晨, 杜联明, 李鹏, 杨茗羽, 李午佼, 沈咏梅, 张修月, 岳碧松, 2015. 德国小蠊全基因组中微卫星分布规律. 昆虫学报, 58(10): 1037 – 1045]

Wang D, Liao XL, Cheng L, Yu XM, Tong JG, 2007. Development of novel EST-SSR markers in common carp by data mining from public EST sequences. *Aquaculture*, 271: 558 – 574.

Wang ZL, Huang J, Du LM, Li WJ, Yue BS, Zhang XY, 2013. Comparison of microsatellites between the genomes of *Tetranychus urticae* and *Ixodes scapularis*. *Sichuan Journal of Zoology*, 32(4): 481 – 486. [汪自立, 黄杰, 杜联明, 李午佼, 岳碧松, 张修月, 2013. 二斑叶螨和肩突硬蜱基因组微卫星分布规律研究. 四川动物, 32(4): 481 – 486]

Wei CM, Kong GY, Lian ZM, Liu H, Fan YW, Zhang H, 2007. Abundance and distribution of microsatellites in the entire *Apis mellifera* genome. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(4): 501 – 504. [魏朝明, 孔光耀, 廉振民, 刘慧, 范永文, 张慧, 2007. 蜜蜂全基因组中微卫星的丰度及其分布. 昆虫知识, 44(4): 501 – 504]

Wierdle M, Dominska M, Petes TD, 1997. Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics*, 146(3): 769 – 779.

Xu JH, Wang NW, Zhang LL, Guan X, 2005. Sdudy on the economic threshold of tea leafhopper (*Empoasca vitis* Gothe). *Journal of Tea Science*, 25(2): 131 – 135. [徐金汉, 王念武, 张灵玲, 关雄, 2005. 假眼小绿叶蝉防治指标的研究. 茶业科学, 25(2): 131 – 135]

Yang Q, Yu DY, 2008. Ecological regulation and management of the populations of *Empoasca vitis* in tea gardens. *Tea of Fujian*, (2): 33 – 35. [杨青, 余德亿, 2008. 茶园假眼小绿叶蝉种群的生态调控. 福建茶叶, (2): 33 – 35]

Zhou NN, Wang MX, Cui L, Pan C, Zhang XT, Han BY, 2014. Genetic variation of *Empoasca vitis* (Göthe) (Hemiptera: Cicadellidae) among different geographical populations based on mtDNA *COI* complete sequence. *Acta Ecologica Sinica*, 34(23): 6879 – 6889. [周宁宁, 王梦馨, 崔林, 潘铖, 张新亭, 韩宝瑜, 2014. 基于 COI 基因全长序列的假眼小绿叶蝉地理种群遗传分化研究. 生态学报, 34(23): 6879 – 6889]

Zhu JQ, 1999. Tea Pests. China Agricultural Scientech Press, Beijing. 96 – 104. [朱俊庆, 1999. 茶树害虫. 北京: 中国农业科学技术出版社. 96 – 104]

(责任编辑: 袁德成)